

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "IULIU HAȚIEGANU" CLUJ-NAPOCA

ȘCOALA DOCTORALĂ

---

TEZĂ DE DOCTORAT - REZUMAT

# Rolul Gla proteinelor în calcificările țesutului moale

---

Doctorand **GHEORGHE Simona Roxana**

---

Conducător de doctorat Prof. Dr. **CRĂCIUN Alexandra**

---

CLUJ-NAPOCA 2021



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

## CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b>	13
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>	
<b>1. Gla Proteinele</b>	19
1.1. Structura și activarea Gla proteinelor	19
1.2. Clasificarea și rolul Gla proteinelor	20
1.3. Rolul vitaminei K în $\gamma$ -carboxilare	22
<b>2. Calcificarea țesutului moale</b>	23
2.1. Tipurile, etiologia și localizarea calcificării țesutului moale	23
2.2. Mecanisme ale calcificării țesutului moale	24
2.3. Exemple de calcificări ale țesutului moale	25
<b>3. Gla proteine extrahepatice implicate în calcificarea țesutului moale</b>	27
3.1. Osteocalcina	27
3.2. Proteina bogată în Gla	27
3.3. Proteina Gla Matriceală	28
<b>4. MGP în patologia tumorală și vasculară</b>	33
4.1. MGP în patologia tumorală	33
4.2. MGP în patologia vasculară	35
<b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ</b>	
<b>1. Ipoteza de lucru și obiective</b>	39
<b>2. Studiul 1. Proteina Gla matriceală în menigioame: Un studiu imunohistochimic</b>	43
2.1. Introducere	43
2.2. Obiective	44
2.3. Material și metodă	44
2.4. Rezultate	45
2.5. Discuții	48
2.6. Concluzii	50
<b>3. Studiul 2. Expresia miR-155-5p și a proteinei Gla matriceale în menigioame</b>	53
3.1. Introducere	53
3.2. Obiective	54
3.3. Material și metodă	54
3.4. Rezultate	56
3.5. Discuții	59
3.6. Concluzii	61
<b>4. Studiul 3. Conformațiile active ale proteinei Gla matriceală în venele sănătoase și varicoase fără calcificări</b>	63
4.1. Introducere	63
4.2. Obiective	63
4.3. Material și metodă	64
4.4. Rezultate	65
4.5. Discuții	70
4.6. Concluzii	72
<b>5. Concluzii generale</b>	73
<b>6. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei</b>	75
<b>REFERINȚE</b>	77

## INTRODUCERE

Proteinele Gla conțin reziduuri de glutamat (Glu) care suferă o carboxilare post-tranlațională dependentă de vitamina K, rezultând reziduuri de  $\gamma$ -carboxylglutamat (Gla), responsabile de legarea ionilor de calciu. Caracteristica comună a acestor proteine este prezența domeniului Gla responsabil pentru chelarea ionilor de calciu.

Până în prezent, au fost descoperite optsprezece proteine Gla, cu roluri în coagularea sângelui, homeostazia calcificării, transport, dezvoltare celulară și câteva cu funcții încă necunoscute.

Proteinele Gla implicate în hemostază sunt factori pro-coagulanți și anti-coagulanți, sintetizați de ficat. Proteinele cu funcție pro-coagulantă sunt factori, II, VII, IX și X, în timp ce proteinele S, C și Z sunt anti-coagulante. Aceste proteine nu posedă proprietăți anti-calcifiere. Proteinele Gla implicate în calcificarea țesuturilor moi sunt Osteocalcina (OC), proteina Gla matriceală (MGP) și proteina bogată în Gla (GRP). Sunt extrahepatice și pot fi găsite în diferite țesuturi. OC are un rol în mineralizarea osoasă, în timp ce MGP și GRP sunt inhibitori ai calcificării țesuturilor.

MGP este una dintre cele mai importante proteine Gla dependente de vitamina K cu un rol primordial în reglarea mecanismelor de calcificare patologică.

Mineralizarea fiziologică sau calcificarea scheletului a fost studiată pe scară largă și s-au descris cu precizie mecanisme, inclusiv promovarea mineralizării în locațiile dorite, precum și inhibarea calcificării țesuturilor moi. Un dezechilibru al mecanismului ulterior duce la dezvoltarea unei mineralizări patologice numite calcificare ectopică. Este un proces multifactorial, care implică numeroase proteine și căi neregulate care nu sunt încă complet elucidate. Se poate datora mutațiilor genetice sau bolilor cronice dobândite, în care cele mai afectate țesuturi aparțin sistemului cardiovascular și articulațiilor, ducând la complicații ale bolii.

Rolul major al MGP este de a inhiba calcificarea țesuturilor moi, prin formele sale active, după carboxilarea și fosforilarea post-tranlațională. În funcție de aceste modificări, MGP poate prezenta diferite conformații: MGP necarboxilat (ucMGP), MGP carboxilat (cMGP), MGP desfosforilat (dpMGP), MGP fosforilat (pMGP) sau combinații ale acestora.

Multe studii au cercetat rolul MGP în calcificarea arterială și articulară și foarte puține s-au concentrat pe calcificarea altor țesuturi moi care pot duce la o evoluție diferită a bolii primare, decât se aștepta inițial.

Această teză prezintă expresia și rolul MGP local în meningioame și vene în raport cu existența calcificării în aceste țesuturi moi, analizând concomitent MGP circulant.

Meningioamele sunt tumori frecvente ale sistemului nervos central, clasificate de Organizația Mondială a Sănătății (OMS) în trei grade pe baza histologiei lor: gradul I (benign), gradul II (atipic) și gradul III (anaplastic). Simptomatologia lor eterogenă, determinată de localizarea lor, duce la un diagnostic adeseori accidental, multe dintre ele fiind descoperite post-mortem. Acestea apar rar la copii și adolescenți, prevalența crescând odată cu vârsta. Femeile de peste 50 de ani par să fie cele mai afectate. Majoritatea meningioamelor diagnosticate sunt de gradul I, aproximativ 80%, tumorile de gradul II reprezintă un sfert din clasa anterioară, iar ultima clasă are o incidență extrem de redusă. Comportamentul meningiomelor de gradul II și III este mai agresiv în comparație cu tumorile de gradul I. Independent de gradul lor OMS, s-a raportat că meningioamele calcificate au o rată de creștere mai lentă și un rezultat favorabil în comparație cu meningioamele necalcificate. Un articol a raportat expresia MGP mRNA în meningioame, fără a se concentra pe identificarea MGP în țesutul tumoral.

Un studiu anterior a etichetat miR-155-5p, un micro ARN specific necodificat (miARN), ca „amprentă digitală” a miARN-ului meningiomului împreună cu alte 13 miARN-uri. Mai mult, s-a constatat că miR-155-5p reglează MGP în cancerul de sân.

Sistemul venos este cunoscut a fi mai puțin predispus la calcificare în comparație cu arterele. Calcificarea venoasă declanșează o cale de diferențiere osteogenă a celulelor musculare netede vasculare (VSMC), ce implică markeri osteogeni. Un singur articol a fost efectuat pe MGP, un marker osteogen, în vene varicoase (VV), iar autorii au raportat o asociere între MGP și calcificarea venoasă, cu predominanța ucMGP locală. Pe de altă parte, cMGP a fost preponderent în venele sănătoase (HV). Mai mult, s-a demonstrat că MGP este sintetizat de VSMC, care fac parte din tunica medie a arterelor și venelor.

În lumina constatărilor anterioare, două studii ale acestei teze s-au concentrat pe rolul MGP în meningioame. În primul studiu, obiectivele au fost identificarea prezenței celor două conformații MGP pe baza statusului carboxilării, ucMGP și cMGP, în meningioamele cu și fără calcificare, pentru a evalua dacă cele două conformații sunt distribuite diferit în tumorile calcificate comparativ cu cele necalcificate, concomitent cu analiza nivelurilor totale de ucMGP (t-ucMGP) circulante. Pentru cel de-al doilea studiu, obiectivele s-au extins, abordând prezența tuturor conformațiilor MGP în meningioamele cu și fără calcificare, precum și determinarea expresiei miR-155-5p în diferite grade OMS și meningioame calcificate / necalcificate.

Pentru cel de-al treilea studiu, atenția sa îndreptat către identificarea prevalenței conformațiilor MGP în peretele venos, pentru a demonstra rolul MGP în homeostazia calcificării venelor. Mai mult, un alt aspect al acestui studiu a implicat evaluarea contribuției MGP total seric (tMGP) de proveniență venoasă la nivelul global de MGP circulant.

Din cunoștințele noastre, această cercetare imunohistochimică a generat:

- primul studiu care a evaluat prezența locală a tuturor conformațiilor MGP în meningioamele cu și fără calcificări;
- primul studiu care a determinat expresia miR-155-5p în meningioame calcificate și necalcificate, precum și în diferite grade OMS ale meningioamelor;
- primul studiu care a evaluat prezența tuturor conformațiilor MGP în HV și VV.

## **CONTRIBUȚIA PERSONALĂ**

### **Obiective**

Rolul principal al MGP în inhibarea calcificării țesuturilor moi a fost cercetat pe larg. Studiile s-au concentrat pe determinarea nivelurilor circulante ale MGP în diferite patologii asociate cu calcificarea ectopică, preponderent calcificarea arterială.

Foarte puțini s-au concentrat pe stabilirea unei legături între expresia locală a MGP și calcificarea țesuturilor moi, alta decât arterială, sau modelul de distribuție a conformațiilor MGP în raport cu calcificarea ectopică.

Scopul acestei teze a fost de a determina o legătură între toate conformațiile MGP exprimate local în țesuturile slab studiate și prezența calcificării. Motivul alegerii meningioamelor și venelor a fost explicat în fiecare studiu.

Cercetarea a avut trei ipoteze majore:

- 1) MGP este prezent în meningioamele calcificate și în vene;
- 2) MGP local are un rol anti-calcifiant și este reglat de miR-155-5p în meningioame.
- 3) Concentrația MGP circulantă se corelează cu prezența calcificării țesuturilor moi.

Pentru a confirma ipotezele menționate mai sus, s-au efectuat primele studii imunohistochimice pentru a identifica toate conformațiile MGP din meningioame și vene, precum și primul studiu pentru a

stabili dacă MGP local în meningioame este reglat de miR-155-5p. Mai mult, ne-am concentrat pe determinarea prezenței conformațiilor locale MGP în raport cu existența calcificării în țesuturile studiate. În plus, concentrația de MGP circulant a fost testată în scopul stabilirii unei asocieri cu calcificarea țesuturilor moi.

Obiectivele generale și specifice ale celor trei studii compilate în această teză sunt prezentate mai jos.

### ***Studiul 1 Proteina Gla Matriceală în meningioame: un studiu imunohistochimic***

#### **Obiectiv general:**

Identificarea MGP local în meningioame și evaluarea MGP circulant.

#### **Obiective specifice:**

#### **Obiectiv principal:**

Identificarea ucMGP și cMGP în meningioame.

#### **Obiective secundare:**

1. Stabilirea distribuției cMGP și ucMGP în meningioamele calcificate și necalcificate;
2. Determinarea concentrației serice t-ucMGP în meningioamele calcificate și necalcificate;
3. Evidențierea unei posibile legături între nivelul circulant și prezența MGP în meningioamele calcificate și necalcificate.

### ***Studiul 2 Expresia miR-155-5p și a proteinei Gla matriceale în meningioame***

#### **Obiectiv general:**

Evaluarea tuturor conformațiilor MGP și determinarea expresiei miR-155-5p în meningioame.

#### **Obiective specifice:**

#### **Obiectiv principal:**

Identificarea tuturor conformațiilor MGP în meningioame și dacă MGP local este reglat de expresia miR-155-5p.

#### **Obiective secundare:**

1. Identificarea tuturor conformațiilor MGP în meningioame de grade diferite și calcificate / necalcificate;
2. Cuantificarea expresiei miR-155-5p în meningioame de grade diferite și calcificate / necalcificate;
3. Analiza unei potențiale relații între prezența conformațiilor locale MGP și expresia miR-155-5p.

### ***Studiul 3 Conformațiile active ale proteinei Gla matriceale în venele sănătoase și varicoase fără calcificări***

#### **Obiectiv general:**

Identificarea tuturor conformațiilor MGP din vene.

#### **Obiective specifice:**

#### **Obiectiv principal:**

Identificarea tuturor conformațiilor MGP și a calcificării în HV și VV

#### **Obiective secundare:**

1. Investigarea distribuției conformațiilor locale MGP în HV și VV
2. Examinarea conformațiilor locale MGP din vene în raport cu prezența calcificării venoase;
3. Compararea distribuția conformațiilor MGP în HV și VV.

## Metodologie generală

### *Colorarea imunohistochimică și evaluarea țesuturilor*

Secțiuni consecutive de țesut gros de 4 μm au fost tăiate din blocurile de parafină cu ajutorul unui microtom și montate pe lame de sticlă. După deparafinarea și rehidratarea țesuturilor, probele au fost colorate pentru conformațiile MGP și von Kossa (vK).

Pentru identificarea imunohistochimică a diferitelor conformații MGP, VitaK BV (Maastricht, Olanda) a furnizat anticorpi monoclonali specifici împotriva cMGP (reziduuri 35-54), pMGP (reziduuri 3-15), ucMGP (reziduuri 35-49) și dpMGP (reziduuri 3-15). Pentru recuperarea antigenului, probele rehidratate au fost încălzite într-o baie de acid citric 0,2% timp de 30 de minute. Am adăugat anticorpii specifici primari împotriva cMGP (1,0 μg / ml), pMGP (0,75 μg / ml), ucMGP (0,9 μg / ml) și dpMGP (1,0 μg / ml), diluați în reactiv de blocare (Roche Diagnostics, Germania). Lamele au fost incubate la 4 ° C până a doua zi dimineața când s-a aplicat IgG anti-șoarece de iepure conjugat cu peroxidază de hrean (1: 100) (Dako, Danemarca) ca anticorp secundar. Anticorpii au fost expuși cu substrat NovaRED (Vector Laboratories, SUA). Pentru controlul negativ am exclus anticorpul primar. Hematoxilina a fost utilizată pentru colorarea nucleelor celulare și probele au fost conservate prin acoperire cu lamele sigilate cu Entellan (Merck, Germania).

Pentru identificarea calcificării, s-a folosit metoda vK prin care lamele au fost deparafinizate și rehidratate, urmate de incubare de 5 minute cu azotat de argint 1%. După spălare, s-a aplicat tiosulfat de sodiu și formaldehidă de sodiu timp de 1 minut pentru a elimina excesul de azotat de argint. S-a folosit roșu nuclear rapid pentru evidențierea nucleilor și am acoperit probele cu lamele.

Un specialist patolog, fără a cunoaște informații legate de probe, a examinat lamelele. Absența conformației MGP sau colorarea vK a fost interpretată ca fiind negativă și prezența celor două colorări specifice în cel puțin un câmp microscopic a fost definită ca pozitivă. Scorul intensității colorării a fost determinat de doi observatori specializați, după cum urmează: 0 = absent, 1 = slab, 2 = moderat și 3 = intens.

### *Evaluarea t-ucMGP și tMGP circulantă*

Pentru analiza serică a t-ucMGP, sângele venos a fost colectat a jeun prin venipunctură de la toți pacienții, înainte de îndepărtarea chirurgicală a tumorii. Înainte de analiză, probele au fost centrifugate și alicotele de ser au fost depozitate la -80 ° C. Nivelurile serice de t-ucMGP au fost măsurate printr-un kit ELISA de tip competitiv (VitaK, Universitatea Maastricht, Olanda).

Pentru evaluarea nivelurilor plasmatice de tMGP, a fost recoltată o probă de sânge venos a jeun de la fiecare subiect în dimineața procedurii chirurgicale și o altă probă la 5 zile după intervenție. Ambele probe au fost colectate în tuburi de citrat de sodiu și plasma obținută după centrifugare a fost păstrată la -80 ° C până la analiză. A fost folosit un kit ELISA de tip sandwich (USCN Life Science Inc., Wuhan, China) și rezultatele au fost citite cu un Organon Reader 230S (Organon Teknika, Oss, Olanda).

### *Procedeele de detectare a expresiei miR-155-5p*

ARN-ul total a fost extras din cele 41 de probe de țesut montate pe lame, după deparafinare cu xilen utilizând kitul miRNeasy FFPE (Qiagen) conform protocolului producătorului. ARN-ul total a fost eluat în 14 μL de apă fără ARNse / ADNse. Cuantificarea a fost efectuată cu fluorometrul Qubit 2.0 (ThermoFisher) cu kitul de testare RNA BR (ThermoFisher). Concentrația medie de ARN a fost de 48 ng / μL (interval 1 - 454 ng / μL). Sinteza cADN pentru detecția miARN specifică a fost realizată folosind kitul miScript II RT (Qiagen) și reacțiile qPCR au fost efectuate în triplicat pe aparatură de PCR în timp real ABI 7900 HT (ThermoFisher), utilizând kitul PCR verde MiScript Sybr (Qiagen) și MiScript Primer teste (Qiagen) pentru miR-155-5p și RNU6 ca genă de menaj. O etapă inițială de activare a polimerazei de 15 min a fost urmată de 40 de cicluri (94 ° C / 15 s, 55 ° C / 30 s, 70 ° C / 35 s). Expresia miR-155-5p a fost

calculată utilizând metoda comparativă  $\Delta Ct$  relativă la RNU6 (12). Modificarea plurilor (FC) a fost calculată pe baza următoarei formule:  $FC = 2 (\Delta Ct_{grup 2} - \Delta Ct_{grup 1})$ .

## Rezultate

### ***Studiul 1. Proteina Gla Matrix în meningioame: un studiu imunohistochimic***

În probele de țesut tumoral calcificat am identificat atât ucMGP ( $r = 0,957$ ,  $p < 0,001$ ), cât și cMGP ( $r = 1$ ,  $p < 0,001$ ), în timp ce tumorile necalcificate au fost negative pentru ambele conformații MGP. Concentrația t-ucMGP serică la pacienții cu meningioame calcificate și necalcificate nu a fost semnificativ diferită ( $3499 \pm 1388$  vs.  $3882 \pm 2558$ ). A existat o corelație pozitivă între calcificare și prezența conformațiilor MGP, precum și între intensitatea calcificării cu uc MGP ( $r = 0,592$ ,  $p < 0,001$ ) și cMGP ( $r = 0,681$ ,  $p < 0,001$ ).

### ***Studiul 2. Expresia miR-155-5p și a proteinei Gla matriceale în meningioame***

Conform clasificării OMS, cele 41 de eșantioane de meningioame meningoteliale, tranzitorii și atipice au fost stratificate în grupuri WHO I și WHO II. Am observat o expresie mai mare a miR-155-5p în grupul WHO I comparativ cu grupul WHO II [ $FC = 3,83$ ,  $p = 0,027$ ]. Mai mult, expresia miR-155-5p a fost mai mare în tumorile calcificate comparativ cu tumorile necalcificate în toate probele ( $FC = 3,01$ ,  $p = 0,047$ ) și în grupul WHO I ( $FC = 3,65$ ,  $p = 0,048$ ). Toate conformațiile MGP au fost prezente concomitent în meningioamele calcificate și absente în cele fără calcificare, indiferent de grup. Expresia miR-155-5p s-a corelat cu clasificarea OMS, dar nu și cu prezența MGP.

### ***Studiul 3. Conformțiile active ale proteinei Gla matriceale în venele sănătoase și varicoase fără calcificari***

Am colectat probe din venă safenă considerată grup de control și țesut din VV, desemnat ca grup VV, de la 20 de pacienți. Nivelurile plasmatice ale tMGP au scăzut semnificativ după îndepărtarea chirurgicală a VV (înainte  $59,5 \pm 17,2$  vs. după  $38,1 \pm 11,3$ ,  $p < 0,001$ ). Am identificat cMGP și pMGP locale în grupul de control și VV, ambele fără calcificare, în timp ce ucMGP și dpMGP au fost absente. cMGP a fost observat în nucleu și citoplasmă și pMGP în nucleul celulelor aparținând tunicii medii, intimei și vasa vasorum. pMGP a fost prezent și în adipocite.

## Concluzii

Cele trei studii incluse în prezenta teză au oferit rezultate esențiale privind expresia locală a MGP în ceea ce privește calcificarea țesuturilor moi, consolidându-și rolul de inhibitor local al mineralizării țesuturilor moi.

### ***Studiul 1. Proteina Gla Matriceală în meningioame: un studiu imunohistochimic***

- Acesta este primul studiu imunohistochimic care demonstrează acumularea locală de MGP în meningioamele calcificate;
- Prezența calcificării în meningioame a fost asociată cu depozite locale de ucMGP și cMGP;
- ucMGP și cMGP nu au fost prezente în meningioamele necalcificate;
- Concentrația de t-ucMGP circulant nu s-a asociat cu expresia locală a MGP în meningioame.

➤ Prezența cMGP în meningioamele calcificate confirmă faptul că forma activă a MGP contribuie la inhibarea calcificării țesuturilor. Un deficit local de vitamina K și limitarea concomitentă a carboxilării proteinelor ar putea fi motivul pentru acumularea ucMGP. Forma inactivă circulantă a MGP nu este influențată de MGP inactive local din meningioame.

### ***Studiul 2. Expresia miR-155-5p și a proteinei Gla matriceale în meningioame***

- Acesta a fost primul studiu care a demonstrat acumularea tuturor conformațiilor MGP în jurul zonelor calcificate ale meningioamelor;

- Niciuna dintre conformațiile MGP nu a fost prezentă în meningioamele necalcificate;
- Expresia miR-155-5p a fost mai mare în meningioamele calcificate comparativ cu meningioamele necalcificate;
- Expresia miR-155-5p a fost mai mare în meningioamele de gradul I versus cele de gradul II.
- A existat o corelație pozitivă între miR-155-5p și clasificarea OMS;
- Nu am găsit nicio corelație între miR-155-5p și expresia locală a MGP.
  - Acest studiu întărește ipoteza că MGP are o acțiune locală anti-calcifiantă prin prezența tuturor conformațiilor MGP în meningioamele calcificate. Expresia miR-155-5p nu reglează prezența locală a MGP, dar ar putea fi utilă în clasificarea moleculară a meningioamelor.

### ***Studiul 3. Conformațiile active ale proteinei Gla matriceale în venele sănătoase și varicoase fără calcificări***

- Acesta este primul studiu care identifică cMGP și pMGP în venele sănătoase și varicoase;
- cMGP și pMGP au fost prezente în vasa vasorum și pMGP și în adipocite;
- ucMGP și dpMGP nu au fost prezente în venele sănătoase și varicoase;
- Concentrația tMGP plasmatică a fost mai mică după îndepărtarea chirurgicală a pachetului varicos;
- Calcificarea nu a fost identificată în venele sănătoase sau varicoase.
  - Formele active ale MGP contribuie local la inhibarea calcificării în vene. Suficiența locală a vitaminei K este demonstrată de absența MGP inactivă. MGP local ar putea fi o parte integrativă a sistemului imunitar cu importanță în inflamația locală. MGP de proveniență venoasă contribuie la concentrația totală a MGP circulant.

### **Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei**

În nenumăratele studii axate pe MGP circulant în calcificarea arterială, în general, această teză a cuprins trei studii concentrate pe identificarea expresiei locale a tuturor conformațiilor MGP în asociere cu existența calcificării în câteva țesuturi puțin cercetate.

Această teză s-a axat pe identificarea imunohistochimică a MGP în țesuturile moi cu sau fără calcificare, împreună cu evaluarea MGP circulantă, cu scopul de a demonstra efectul local al proteinei asupra debutului sau dezvoltării calcificării.

Am putut raporta, pentru prima dată, prezența tuturor conformațiilor MGP în meningioamele calcificate, indicând existența unui mecanism care limitează dezvoltarea calcificării meningiomului.

Mai mult, pentru prima dată, această teză a demonstrat implicarea locală a MGP activ în inhibarea calcificării peretelui venos. În plus, am sugerat că MGP secretat din VSMC-urile venelor contribuie în mare măsură la MGP-ul total circulant.

Această teză ar putea fi considerată de mare importanță datorită clarificării mecanismelor locale de inhibare a calcificării ectopice, având în vedere că obiectivele au fost atinse și această cercetare a deschis oportunități pentru viitoare studii în domeniu.

“IULIU HAȚIEGANU” UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY CLUJ-NAPOCA

PHD SCHOOL

---

Ph.D. THESIS - ABSTRACT

# The Role of Gla Proteins in Soft Tissue Calcifications

---

PhD Candidate **Simona Roxana GHEORGHE**, MD

---

Scientific Coordinator Prof. **Alexandra CRĂCIUN**, MD, PhD

---

CLUJ-NAPOCA 2021



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

## CONTENTS

<b>INTRODUCTION</b>	13
<b>CURRENT STATE OF KNOWLEDGE</b>	
<b>1. Gla Proteins</b>	19
1.1. Structure and Activation of Gla Proteins	19
1.2. Classification and Role of Gla Proteins	20
1.3. The Role of Vitamin K in $\gamma$ -carboxylation	22
<b>2. Soft Tissue Calcification</b>	23
2.1 Types, Etiology and Location of Soft Tissue Calcification	23
2.2 Pathways of Soft Tissue Calcification	24
2.3 Examples of Soft Tissue Calcification	25
<b>3. Extra-hepatic Gla Proteins Involved in Soft Tissue Calcification</b>	27
3.1 Osteocalcin	27
3.2 Gla Rich Protein	27
3.3 Matrix Gla Protein	28
<b>4. MGP in Tumor and Vascular Pathology</b>	33
4.1 MGP in Tumor Pathology	33
4.2 MGP in Vascular Pathology	35
<b>PERSONAL CONTRIBUTION</b>	
<b>1. Work Hypothesis and Objectives</b>	39
<b>2. Study 1. Matrix Gla Protein in Meningiomas: An Immunohistochemical Study</b>	43
2.1. Introduction	43
2.2. Objectives	44
2.3. Material and method	44
2.4. Results	45
2.5. Discussion	48
2.6. Conclusions	50
<b>3. Study 2. The Expression of miR-155-5p and Local Matrix Gla Protein in Meningiomas</b>	53
3.1. Introduction	53
3.2. Objectives	54
3.3. Material and method	54
3.4. Results	56
3.5. Discussion	59
3.6. Conclusions	61
<b>4. Study 3. The Active Conformations of Matrix Gla Protein in Healthy and Varicose Veins Without Calcification</b>	63
4.1. Introduction	63
4.2. Objectives	63
4.3. Material and method	64
4.4. Results	65
4.5. Discussion	70
4.6. Conclusions	72
<b>5. General conclusions</b>	73
<b>6. Originality and innovative contributions</b>	75
<b>REFERENCES</b>	77

**Keywords:** matrix Gla protein, calcification, meningioma, vein, miR-155-5p

## INTRODUCTION

Gla proteins are a family of glutamate (Glu) containing residues which suffer a vitamin K dependent post-translational carboxylation resulting  $\gamma$ -carboxyglutamate residues (Gla), responsible for binding calcium ions. The common characteristic of these proteins is the presence of the Gla domain accountable for chelating calcium ions.

To this date, eighteen Gla proteins have been discovered, with roles in blood coagulation, calcification homeostasis, transport, cell migration and a few with yet unknown functions.

Gla proteins involved in hemostasis are pro-coagulant and anti-coagulant factors, synthesized by the liver. The proteins with pro-coagulant function are factors, II, VII, IX and X, while protein S, C and Z are anti-coagulant. These proteins do not possess anti-calcifying properties. The Gla proteins implicated in soft tissue calcification are Osteocalcin (OC), matrix Gla protein (MGP) and Gla rich protein (GRP). They are extrahepatic and can be found in various tissues. OC has a role in bone mineralization, while MGP and GRP are tissue calcification inhibitors.

MGP is one of the most important Gla protein dependent of vitamin K with a paramount role in regulating the mechanisms of pathological calcification.

Physiological mineralization, or calcification, of the skeleton has been widely studied and found to have precisely described mechanisms including the promotion of mineralization at desired locations as well as the inhibition of soft tissue calcification. An imbalance of the later mechanism leads to the development of a pathological mineralization called ectopic calcification. It is a multifactorial process, involving numerous proteins and dysregulated pathways not entirely elucidated yet. It can be due to genetic mutations or acquired chronic diseases, in which the most affected tissues pertain to the cardiovascular system and the joints, leading to disease complications.

The major role of MGP is to inhibit soft tissue calcification, through its active forms, after the post-translational carboxylation and phosphorylation. Depending on these modifications, MGP may present different conformations: uncarboxylated MGP (ucMGP), carboxylated MGP (cMGP), desphosphorylated MGP (dpMGP), phosphorylated MGP (pMGP), or combinations thereof.

Many studies have researched the role of MGP in arterial and joint calcification and very few have focused on calcification of other soft tissues which can lead to a different development of the primary disease, than initially expected.

This thesis presents the expression and role of local MGP in meningiomas and veins in relation to the existence of calcification in these soft tissues, concomitantly analyzing the circulating MGP.

Meningiomas are frequent tumors of the central nervous system, classified by the World Health Organization (WHO) in three grades based on their histology: grade I (benign), grade II (atypical) and grade III (anaplastic). Their heterogeneous symptomatology, greatly determined by their location, leads to rather accidental diagnosis, many of them being discovered postmortem. They rarely appear in children and adolescents, the prevalence increasing with age. Females over 50 years of age seem to be the most affected. The majority of the diagnosed meningiomas are grade I, approximately 80%, grade II tumors account for a quarter of the previous grade and the latter grade is extremely scarce. The behavior of grade II and III meningiomas is more aggressive compared to grade I tumors. Independent of their WHO grade, calcified meningiomas have been reported to have a slower growth rate and a favorable outcome compared to non-calcified meningiomas. One article has reported the expression of MGP mRNA in meningiomas, not focusing on identifying MGP in the tumor tissue.

A previous study labeled miR-155-5p, a short noncoding specific micro RNA (miRNA), as the meningioma miRNA "fingerprint" along with other 13 miRNA's. Furthermore, miR-155-5p has been found to regulate MGP in breast cancer.

The venous system is known to be less prone to calcification compared to the arteries. Venous calcification triggers a pathway of vascular smooth muscle cell (VSMC) osteogenic differentiation, related to osteogenic markers. Only one article was conducted on MGP, an osteogenic marker, in varicose veins (VV), and the authors reported an association between MGP and venous calcification, with the predominance of local ucMGP. On the other hand, cMGP was preponderant in healthy veins (HV). Moreover, it was demonstrated that MGP is synthesized by the VSMCs, which are part of the tunica media of arteries and veins.

In light of the previous findings, two studies of this thesis concentrated on the role of MGP in meningiomas. In the first study, the aims were to identify the presence of the two MGP conformations based on the carboxylation status, ucMGP and cMGP, in meningiomas with and without calcification, to evaluate whether the two conformations are differently distributed in calcified compared to non-calcified tumors, concomitant with the analysis of circulating total ucMGP (t-ucMGP) levels. For the second study, the objectives expanded, addressing the presence of all MGP conformations in meningiomas with and without calcification, as well as the determination of miR-155-5p expression in different WHO grade and calcified/non-calcified meningiomas.

For the third study, the attention shifted towards identifying the prevalence of the MGP conformations in the venous wall in order to demonstrate the role of MGP in the calcification homeostasis of the veins. Furthermore, another aspect of this study involved the assessment of the contribution of serum total MGP (tMGP) of venous provenience to the overall pool of circulating MGP.

To our knowledge, this immunohistochemical research yielded:

- the first study to evaluate the local presence of all MGP conformations in meningiomas with and without calcification;
- the first study to determine the expression of miR-155-5p in calcified and non-calcified, as well as different WHO grade meningiomas;
- the first study to assess the presence of all MGP conformations in HV and VV.

## **PERSONAL CONTRIBUTION**

### **Objectives**

The paramount role of MGP in inhibiting soft tissue calcification has been extensively researched. Studies have concentrated on determining circulating levels of MGP in different pathologies associated with ectopic calcification, more specifically arterial calcification.

Very few have been focused on establishing a link between the local expression of MGP and soft tissue calcification, other than arterial, or the distribution pattern of MGP conformations in relation to ectopic calcification.

The aim of this thesis was to determine a connection between all MGP conformations expressed locally in poorly studied tissues and the presence of calcification. The reason for choosing meningiomas and veins were explained in each study.

The research had three major hypotheses:

- 1) MGP is present in calcified meningiomas and in veins;
- 2) Local MGP has an anti-calcifying role and is regulated by miR-155-5p in meningiomas.
- 3) The concentration of circulating MGP correlates with the presence of soft tissue calcification.

In order to confirm the aforementioned hypotheses, the first immunohistochemical studies were conducted to identify all MGP conformations in meningiomas and veins, as well as the first study to establish whether local MGP in meningiomas is regulated by miR-155-5p. Moreover, we have focused on determining the presence of local MGP conformations in relation to the existence of calcification in the

studied tissues. In addition, the concentration of circulating MGP was assayed for the purpose of establishing an association with soft tissue calcification.

The general and specific objectives of the three studies compiled in this thesis are presented below.

### ***Study 1 Matrix Gla Protein in Meningiomas: An Immunohistochemical Study***

#### **General objective:**

Identification of local MGP in meningiomas and assessment of circulating MGP.

#### **Specific objectives:**

##### ***Main objective:***

To identify ucMGP and cMGP in meningiomas.

##### ***Secondary objectives:***

1. To establish whether cMGP and ucMGP are differently distributed in calcified and non-calcified meningiomas;
2. To determine the concentration of serum t-ucMGP in calcified and non-calcified meningiomas;
3. To find a possible association between circulating and local MGP in calcified and non-calcified meningiomas.

### ***Study 2 The Expression of miR-155-5p and Local Matrix Gla Protein in Meningiomas***

#### **General objective:**

Assessment of all MGP conformations and determination of miR-155-5p expression in meningiomas.

#### **Specific objectives:**

##### ***Main objective:***

To analyze if all MGP conformations are present in meningiomas and if local MGP is regulated by miR-155-5p expression.

##### ***Secondary objectives:***

1. To identify the presence of all MGP conformations in different WHO grade and calcified/non-calcified meningiomas;
2. To quantify the expression of miR-155-5p in different WHO grade and calcified/non-calcified meningiomas;
3. To analyze a potential relationship between the presence of local MGP conformations and the expression of miR-155-5p.

### ***Study 3 The active conformations of Matrix Gla Protein in Healthy and Varicose Veins without calcification***

#### **General objective:**

Identification of all MGP conformations in veins.

#### **Specific objectives:**

##### ***Main objective:***

To assess the presence of all MGP conformations and calcification in HV and VV

##### ***Secondary objectives:***

1. To investigate the pattern of local MGP conformations in HV and VV
2. To examine local MGP conformations in veins in relation to the presence of venous calcification;
3. To compare the distribution of MGP conformations in HV and VV

## **General methodology**

### *Immunohistochemical tissue staining and evaluation*

Consecutive sections of 4 µm thick tissue were cut from the paraffin blocks with the help of a microtome and mounted on glass slides. After deparaffinization and tissue rehydration, samples were stained for MGP conformations and von Kossa (vK).

For the immunohistochemical identification of the different MGP conformations, VitaK BV (Maastricht, The Netherlands) provided specific monoclonal antibodies against cMGP (residues 35–54), pMGP (residues 3–15), ucMGP (residues 35–49) and dpMGP (residues 3–15). For antigen retrieval, the rehydrated samples were heated in a 0.2% bath of citric acid for 30 minutes. We added the primary specific antibodies against cMGP (1.0 µg/ml), pMGP (0.75 µg/ml), ucMGP (0.9 µg/ml) and dpMGP (1.0 µg/ml), diluted in blocking reagent (Roche Diagnostics, Germany). The slides were incubated at 4°C until the next morning when diluted (1:100) horse radish peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse IgG (Dako, Denmark) was applied as the secondary antibody. The antibodies were exposed with NovaRED substrate kit (Vector Laboratories, USA). For the negative control we excluded the primary antibody. Hematoxylin was used for cell nuclei coloration and samples were preserved with Entellan (Merck, Germany) mounted coverslips.

For the identification of calcification, we used the vK staining by which the sample slides were deparaffinized and rehydrated, followed by 5 minutes incubation with 1% silver nitrate. After washing, we applied sodium thiosulfate and sodium formaldehyde for 1 minute to eliminate the excess of silver nitrate. We used nuclear fast red as a counterstain and covered the samples with coverslips.

A pathology specialist, blinded to the study population, examined the sample slides. Absence of MGP conformation or vK staining was interpreted as negative and the presence of the two specific stainings in at least one microscopic field was defined as positive. The staining intensity score was determined by two specialized and independent observers, as follows: 0 = absent, 1 = weak, 2 = moderate and 3 = intense.

#### *Circulating t-ucMGP and tMGP assessment*

For serum t-ucMGP analysis, after overnight fasting, venous blood was collected by venipuncture from all patients before surgical removal of the tumor. Prior to analysis, the samples were centrifuged and aliquots of serum were stored at -80°C. Serum t-ucMGP levels were measured by a competitive mono-antibody ELISA kit (VitaK, Maastricht University, The Netherlands).

For the assessment of tMGP plasma levels, a venous blood sample was collected from each subject in the morning of the surgical procedure and another sample 5 days after the intervention. Both samples were collected in sodium citrate tubes and the plasma obtained after centrifugation was preserved at -80°C until analysis. A sandwich ELISA kit (USCN Life Science Inc., Wuhan, China) was used and results were read with an Organon Reader 230S (Organon Teknika, Oss, the Netherlands).

#### *miR-155-5p detection process*

Total RNA was extracted from the 41 tissue samples mounted on slides after xylene deparaffinization using the miRNeasy FFPE kit (Qiagen) according to manufacturer protocol. The total RNA was eluted in 14 µL RNase/DNase free water. Quantitation was performed with the Qubit 2.0 Fluorometer (ThermoFisher) with the RNA BR Assay Kit (ThermoFisher). The mean RNA concentration was 48 ng/ µL (range 1 – 454 ng/ µL). cDNA synthesis for specific miRNA detection was carried out using miScript II RT kit (Qiagen) and qPCR reactions were performed in triplicate on an ABI 7900 HT real time PCR machine (ThermoFisher), using the miScript Sybr green PCR kit (Qiagen) and miScript Primer assays (Qiagen) for miR-155-5p and RNU6 as housekeeping gene. An initial 15 min polymerase activation step was followed by 40 cycles (94 °C/15 s, 55 °C/30 s, 70 °C/35 s). The miR-155-5p expression was calculated using the comparative  $\Delta\text{Ct}$  method relative to the RNU6 (12). The fold change (FC) was calculated based on the following formula:  $\text{FC} = 2^{(\Delta\text{Ct}_{\text{group 2}} - \Delta\text{Ct}_{\text{group 1}})}$ .

## **Results**

### ***Study 1. Matrix Gla Protein in Meningiomas: An Immunohistochemical Study***

In calcified tumor tissue samples we identified both ucMGP ( $r = 0.957$ ,  $p < 0.001$ ) and cMGP ( $r = 1$ ,  $p < 0.001$ ), while non-calcified tumors were negative for both MGP conformation deposits. The concentration of serum t-ucMGP in patients with calcified and non-calcified meningiomas were not significantly different ( $3499 \pm 1388$  vs.  $3882 \pm 2558$ ). There was a positive correlation between calcification and the presence of MGP conformations, as well as between the intensity of the calcification with ucMGP ( $r = 0.592$ ,  $p < 0.001$ ) and cMGP ( $r = 0.681$ ,  $p < 0.001$ ).

### ***Study 2. The Expression of miR-155-5p and Local Matrix Gla Protein in Meningiomas***

According to the WHO classification, our 41 samples of meningiothelial, transitional and atypical meningiomas were stratified in groups WHO I and WHO II. We observed a higher miR-155-5p expression in group WHO I versus group WHO II [with a fold change (FC) of 3.83,  $p = 0.027$ ]. Moreover, the expression of miR-155-5p was higher in calcified tumors compared to non-calcified tumors in all samples (FC=3.01,  $p = 0.047$ ) and in group WHO I (FC=3.65,  $p = 0.048$ ). All MGP conformations were concurrently present in calcified meningiomas and absent in those without calcification, regardless of the group. The miR-155-5p expression correlated with the WHO classification, but not with the presence of MGP.

### ***Study 3. The Active Conformations of Matrix Gla Protein in Healthy and Varicose Veins Without Calcification***

We collected samples from the great saphenous vein considered as control group and tissue from the VV, designated as VV group, from 20 patients. Plasma levels of tMGP significantly decreased after the surgical removal of the VV (before  $59.5 \pm 17.2$  vs. after  $38.1 \pm 11.3$ ,  $p < 0.001$ ). We identified local cMGP and pMGP in the control and VV group, both without calcification, while ucMGP and dpMGP were absent. cMGP was observed in the nucleus and cytoplasm and pMGP in the nucleus of cells belonging to the tunica media, tunica intima and vasa vasorum. pMGP was also present in adipocytes.

## **Conclusions**

The three studies included in the present thesis yielded essential aspects on the local expression of MGP in regard to soft tissue calcification, reinforcing its role of local tissue mineralization inhibitor.

### ***Study 1. Matrix Gla Protein in Meningiomas: An Immunohistochemical Study***

- This is the first immunohistochemical study that demonstrates the local accumulation of MGP in calcified meningiomas;
- The presence of calcification in meningiomas was associated with local deposits of ucMGP and cMGP;
- ucMGP and cMGP were not present in non-calcified meningiomas;
- The concentration of circulating t-ucMGP did not associate with the local expression of MGP in meningiomas.
  - The presence of cMGP in calcified meningioma confirms that the active form of MGP contributes to the inhibition of tissue calcification. A local deficiency of vitamin K and subsequent limitation of protein carboxylation might be the reason for the accumulation of ucMGP. The circulating inactive form of MGP is not influenced by the inactive MGP from meningiomas.

### ***Study 2. The Expression of miR-155-5p and Local Matrix Gla Protein in Meningiomas***

- This was the first study to demonstrate the accumulation of all MGP conformations around the calcified areas of the meningiomas;

- None of the MGP conformations were present in non-calcified meningiomas;
- The expression of miR-155-5p was higher in calcified compared to non-calcified meningiomas;
- The expression of miR-155-5p was higher in WHO grade I versus WHO grade II meningiomas.
- There was a positive correlation between miR-155-5p and the WHO classification;
- We found no correlation between miR-155-5p and local expression of MGP.
  - This study strengthens the hypothesis that MGP has a local anti-calcifying action through the presence of all MGP conformations in calcified meningiomas. The expression of miR-155-5p has no regulatory effect on the presence of local MGP but it might be useful in the molecular classification of meningiomas.

### ***Study 3. The active conformations of Matrix Gla Protein in Healthy and Varicose Veins without calcification***

- This is the first study to identify cMGP and pMGP in healthy and varicose veins;
- cMGP and pMGP were present in the vasa vasorum and pMGP in the adipocytes as well;
- ucMGP and dpMGP were not present in healthy and varicose veins;
- The concentration of plasma tMGP was lower after the surgical venous stripping;
- Calcification was not identified in healthy or varicose veins.
  - The active forms of MGP are locally contributing to the inhibition of calcification in veins. The sufficiency of local vitamin K is shown by the absence of inactive MGP. Local MGP could be an integrative part of the immune system and contribute to the local inflammation. MGP of venous provenience contributes to the overall concentration of circulating MGP.

## **ORIGINALITY AND INNOVATIVE CONTRIBUTIONS OF THE THESIS**

In the multitude of studies focused on circulating MGP in relation to arterial calcification, in general, this thesis comprised three studies concentrated on identifying the local expression of all MGP conformations in connection to the existence of calcification in a few scarcely researched tissues.

This thesis centered on the immunohistochemical identification of MGP in soft tissues with or without calcification, coupled with the assessment of circulating MGP, with the purpose of demonstrating the local effect of the protein on calcification debut or development.

We were able to report, for the first time, the presence of all MGP conformations in calcified meningiomas, indicating the existence of a mechanism that limits the development of meningioma calcification.

Moreover, for the first time, this thesis demonstrated the local involvement of active MGP in inhibiting the calcification of the venous wall. In addition, we suggested that MGP secreted from the VSMCs of the veins greatly contribute to the overall circulating MGP.

This thesis could be considered of great importance in better understanding the local mechanisms of ectopic calcification inhibition, considering that the objectives have been achieved and this research has opened opportunities for future studies in the field.